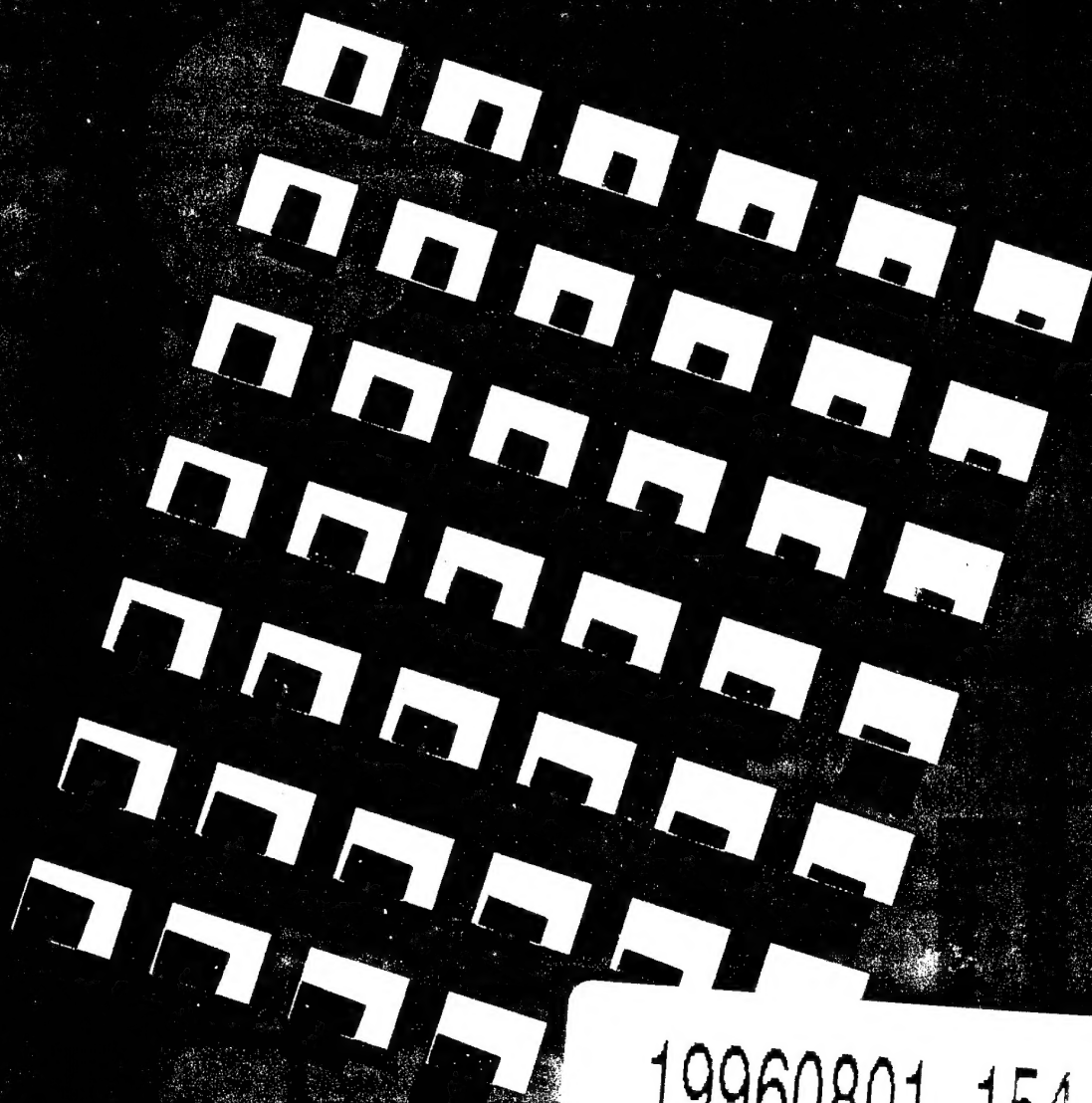


TNO-rapport  
PML 1995-A80

Abiotische en biotische afbraak van 2,4,6-  
trinitrotolueen in grond en water.  
Literatuurstudie en aanbevelingen voor  
analytisch onderzoek

TNO Prins Maurits Laboratorium



19960801 154



TNO-rapport  
PML 1995-A80

TNO Prins Maurits Laboratorium

Lange Kleiweg 137  
Postbus 45  
2280 AA Rijswijk

Telefoon 015 284 28 42  
Fax 015 284 39 63

**Abiotische en biotische afbraak van 2,4,6-trinitrotolueen in grond en water.  
Literatuurstudie en aanbevelingen voor  
analytisch onderzoek**

Datum  
mei 1996

Auteur(s)  
Dr. Ch.E. Kientz

DISTRIBUTION STATEMENT A

Approved for public release;  
Distribution Unlimited

Rubricering

Vastgesteld door : Drs. N.H.A. van Ham  
Vastgesteld d.d. : 1 mei 1996  
(de rubricering wijzigt niet)

Titel : Ongerubriceerd  
Managementuittreksel : Ongerubriceerd  
Samenvatting : Ongerubriceerd  
Rapporttekst : Ongerubriceerd

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de Algemene Voorwaarden voor Onderzoeksopdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen partijen gesloten overeenkomst. Het ter inzage geven van het TNO-rapport aan direct belanghebbenden is toegestaan.

Exemplaar nr. : 9  
Oplage : 21  
Aantal pagina's : 21 (excl. RDP & distributielijst)  
Aantal bijlagen : -

© 1995 TNO

TNO Prins Maurits Laboratorium is onderdeel van de hoofdgroep TNO-Defensieonderzoek waartoe verder behoren:

TNO Fysisch en Elektronisch Laboratorium  
TNO Technische Menskunde



DTIC QUALITY INSPECTED 1

Nederlandse Organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijk onderzoek TNO

## Managementuittreksel

Titel : Abiotische en biotische afbraak van 2,4,6-trinitrotolueen in grond en water.  
Literatuurstudie en aanbevelingen voor analytisch onderzoek  
Auteur(s) : Dr. Ch.E. Kientz  
Datum : mei 1996  
Opdrachtnr. : R87/KL/071  
Rapportnr. : PML 1995-A80

Sinds 1902 wordt 2,4,6-trinitrotolueen (TNT) veelvuldig gebruikt in munitie. Op militaire faciliteiten waar met munitie gewerkt wordt of, indien deze niet meer aan de vereiste specificaties voldoet, munitie vernietigd wordt via verbranding of detonatie, kan verontreiniging van de bodem en grondwater een ernstig milieu-probleem vormen.

In de literatuur is de abiotische en biotische afbraak van TNT en verwante verbindingen in water en grond uitvoerig beschreven. Door de vele studies die in het verleden verricht zijn, is er goede vooruitgang geboekt in de kennisopbouw over de afbraak van deze verbindingen. Recente onderzoeken waarbij micro-biologische processen toegepast worden om met TNT verontreinigde grond en water te zuiveren zijn veelbelovend.

De afbraak van TNT onder aërobische zowel als anaërobische condities verloopt voornamelijk via een reductie. De nitrogroep van TNT wordt gereduceerd via nitroso- en hydroxylamino-intermediären tot aminodinitrotoluenen. Hierbij kunnen resistente azoxy dimeren ontstaan. De gevormde ontledingsprodukten zijn in verband met hun toxiciteit echter minder gewenst dan TNT. Daarnaast wordt veelvuldig melding gemaakt van het feit dat een belangrijk deel (20-60%), afhankelijk van de grond, permanent en in een nog onbekende vorm gebonden wordt aan de humusfractie. Dit kon worden aangetoond door de afbraak van TNT te volgen via radioactief gemerkte koolstof ingebouwd in de TNT-ring.

Mineralisatie van TNT treedt uitsluitend onder aërobe condities op, waarbij de opbrengst het hoogste is indien de micro-biologische afbraak gecombineerd wordt met een fotochemische degradatie.

De monsterbehandeling en opslag blijkt één van de meest kritische factoren te zijn in het analytisch onderzoek. Monsters dienen in het donker snel gekoeld of bij voorkeur snel ingevroren te worden. Aangezien dit in de praktijk vaak niet eenvoudig te realiseren is, verdient het aanbeveling te onderzoeken of in situ extractie via grondwater of aan grond toegevoegd water op adsorptie kolommen mogelijk is. De in de literatuur vaak toegepaste ultrasone extractie gedurende 18 uur is aanzienlijk langer dan die door het TNO Prins Maurits Laboratorium (TNO-PML)

toegepast (1 uur) wordt. In verband met de degradatie van TNT in water onder invloed van licht, verdient het aanbeveling extractiebuizen van donker glas te gebruiken en te onderzoeken of een korte ultrasoon behandeling voldoet. De vloeistofchromatografische analyse van TNT en degradatieprodukten zelfs in de aanwezigheid van andere explosieve stoffen vormt geen probleem. Gebruik van kolommen met een hydrofobe alkyl-functie in combinatie met circa 1:1 v/v water/methanol of water/acetonitril volstaat in de meeste gevallen. Indien zich dan nog scheidingsproblemen voordoen kan ook gebruik worden gemaakt van scheidingskolommen met een cyano-functie. Bovendien zijn de ontwikkelingen met micellaire elektrokinetische capillaire elektroforese veelbelovend. Ondanks deze positieve ontwikkelingen op analytisch gebied is er een gebrek aan gestandaardiseerde en/of gecertificeerde analyse-methoden. In de literatuur wordt gesteld dat dit wordt veroorzaakt door het ontbreken van goede gecertificeerde referentiestoffen.

## Samenvatting

De verontreiniging van het milieu door gebruik van explosieve stoffen en verwante verbindingen ten gevolge van militaire activiteiten is reeds lang bekend. In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de literatuur waarin de abiotische en biotische afbraak van 2,4,6-trinitrotolueen (TNT) en verwante verbindingen beschreven wordt. Door de vele studies die in het verleden verricht zijn, is er tegenwoordig veel bekend over de afbraak van deze verbindingen. Recente onderzoeken waarbij micro-biologische processen toegepast worden om met TNT verontreinigde grond en water te zuiveren zijn veelbelovend.

Tevens wordt een overzicht gegeven van kwalitatieve en kwantitatieve procedures om residuen van TNT te bepalen. Hierbij wordt aandacht gegeven aan de houdbaarheid van de monsters, vloeistof-vloeistof- en vaste-fase extractie, de recovery en de vloeistofchromatografische bepaling. Tenslotte wordt het recent gebruik van micellaire elektrokinetische capillaire elektroforese voor de analyse van TNT en verwante verbindingen behandeld.

## Inhoud

Managementuittreksel .....	2
Samenvatting .....	4
1     Inleiding .....	6
1.1     Abiotische degradatie .....	6
1.2     Biotische anaërobe en aërobe degradatie.....	7
2     Aanbevelingen voor analytisch onderzoek .....	11
2.1     Houdbaarheid van TNT-grondmonsters .....	11
2.2     Analyse van TNT en degradatieprodukten .....	12
3     Conclusies en aanbevelingen .....	16
4     Literatuur.....	17
5     Ondertekening .....	21

## 1 Inleiding

Sinds 1902 wordt 2,4,6-trinitrotolueen (TNT) veelvuldig gebruikt in munitie. Op militaire faciliteiten waar met munitie gewerkt en geoefend wordt of, munitie vernietigd wordt via verbranding of detonatie, wanneer deze niet meer aan de vereiste specificaties voldoet, kan verontreiniging van de bodem en grondwater een ernstig milieuprobleem vormen. In het verleden werden bijvoorbeeld in de Verenigde Staten regelmatig hoge concentraties van TNT in de grond gevonden (1). Een bekend voorbeeld in de Verenigde Staten is de sinds 1945 niet meer in gebruik zijnde munitieproductiefaciliteit bij Weldon Spring MO. Dat er nog steeds een grote hoeveelheid TNT in de grond aanwezig is wordt veroorzaakt door een combinatie van factoren zoals: het droge klimaat, de soort grond en in belangrijke mate de hoge concentratie TNT waardoor de afbraak door micro-organismen of schimmels (micro-biologische afbraak) toxisch geremd wordt. Ten gevolge van de hoge toxiciteit van TNT (2) is in het algemeen bodemsanering gewenst. Verassing van de grond is momenteel de meest effectieve technologie voor de reiniging van de grond. Dit is echter als gevolg van onder andere het uitgraven en transport van de grond ook de meest kostbare methode. Bovendien wordt bij het energie-verslindende verassingsproces de grond vernietigd tot een primair as residu (3). Verwijdering van de TNT bodemverontreiniging in situ door gebruik te maken van micro-organismen via bemesting is een realistisch alternatief (4). In het verleden werd zeer veel onderzoek verricht aan de abiotische en biotische degradatie van TNT in grond. Omdat het essentieel is om analytisch in staat te zijn de degradatie van TNT te kunnen volgen werd eveneens veel onderzoek verricht op analytisch gebied.

Een literatuur (voor)selectie werd gemaakt aan de hand van uittreksels. Relevante artikelen, literatuuroverzichten en rapporten werden verzameld en bestudeerd. Het onderstaande geeft een evaluatie van een deel van het onderzoek dat op het gebied van de afbraak van TNT in grond en water en monsterbehandeling en analyse verricht is.

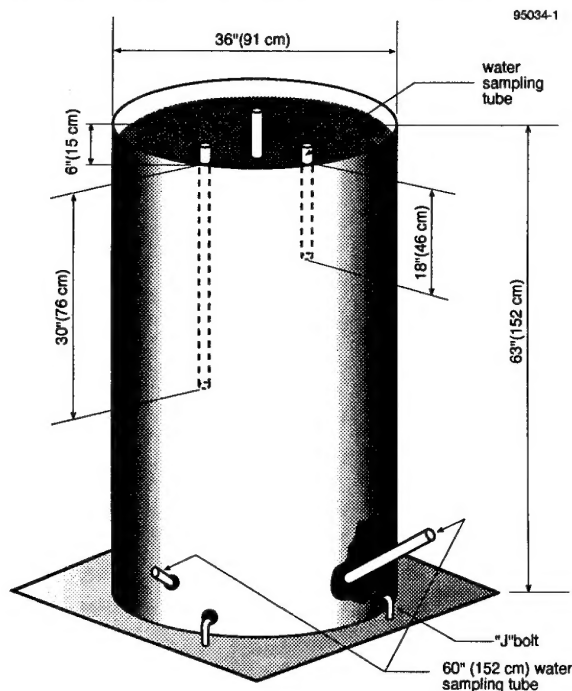
### 1.1 Abiotische degradatie

In steriele grond schijnt TNT persistent te zijn. Onder natuurlijke omstandigheden is er nauwelijks emissie door verdamping (emissie vanuit waterig milieu: halfwaarde tijd ( $t_{1/2}$ ) = circa 30 jaar) noch hydrolyse van het molecuul ( $t_{1/2}$  > 50 jaar) (5). Echter onder invloed van zonlicht en water treedt relatief snel ( $t_{1/2}$  = circa 0.5 dag) fotochemische omzetting op (6). Deze leidt tot het zogenaamd 'roze water' een mengsel van een aantal produkten, zoals, gerangschikt naar afnemende concentratie: 1,3,5-trinitrobenzeen, 2,4,6-trinitrobenzaldehyde, 2,4,6-trinitrobenzylalcohol, 2,4,6-trinitrobenzoëzuur, verscheidene aminodinitro- en diammonitrotoluenen, 2,4,6-trinitrobenzonitril, 4,6-dinitroanthranil en verscheidene gesubstitueerde en gecondenseerde azo en azoxy verbindingen (6-8). Deze

fotocchemische omzetting geeft echter geen vermindering van de toxiciteit omdat verscheidene gevormde ontledingsprodukten eveneens toxisch zijn (9).

## 1.2 Biotische anaërobe en aërobe degradatie

Het meeste onderzoek dat over dit onderwerp is gepubliceerd, werd in het laboratorium op kleine of grote schaal uitgevoerd en in enkele gevallen in situ. Een van de eerste onderzoeken op relatief grote schaal werd beschreven door Hale et al. (10). De onderzoekers bestudeerden de migratie en ontleding van explosieve stoffen waaronder TNT in grondwater zowel als in grond. Hierbij werd gebruik gemaakt van een lysimeter (zie figuur 1). Een stalen pijp (0,9 m ID x 1,5 m L) die tot een diepte van 1,5 m de grond in wordt gedreven en opgehaald om een intakte kolom grond te verkrijgen. Simultaan werd 'ring-labeled' [ $^{14}\text{C}$ ] TNT (radioactief gemerkte koolstof ingebouwd in de TNT-ring) op een kolom van geringere afmetingen (5 cm ID x 60 cm L) aangebracht. Op de eerste 7 cm van de lysimeter werd 2 gew. % TNT aangebracht. Radioactiviteitsmetingen en analyses werden uitgevoerd om migratie en ontleding te kunnen volgen. In een periode van 6 maanden werd zowel weinig  $^{14}\text{CO}_2$  gemeten boven de grond als enige  $^{14}\text{C}$  migratie van componenten naar de onderkant van de kolom. De migratie was te traag voor de gekozen periode van zes maanden. De doelstelling van de studie werd slechts gedeeltelijk gehaald aangezien de concentraties van TNT en ontledingsprodukten te laag waren (<200 ppb) om goed te kwantificeren. Als oorzaak werd genoemd de slechte oplosbaarheid en fixatie van TNT en ontledingsprodukten aan de grond.



Figuur 1: Lysimeter (10).

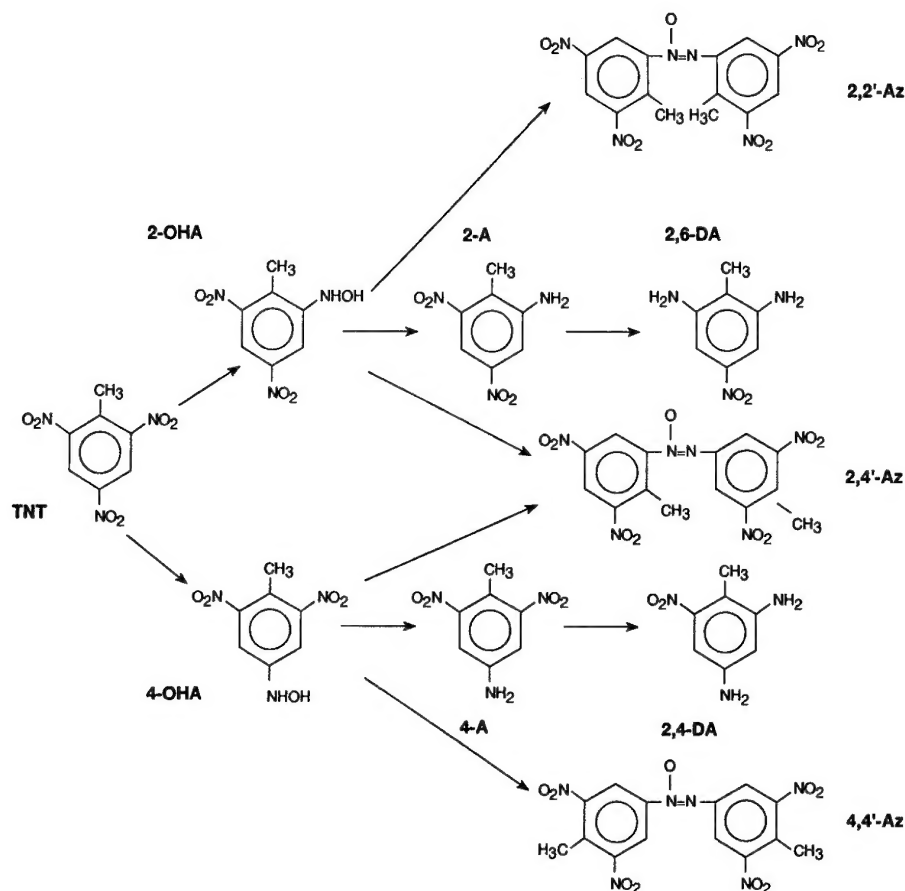


Naast laboratoriumstudies waarbij de afbraak van TNT in grond analytisch gevolgd werd, zijn er micro-biologische studies verricht. Hierbij werden bacteriën of schimmels eventueel in combinatie met additieven zoals bijvoorbeeld glucose of stikstofverbindingen toegevoegd aan de grond om de degradatie van TNT te bevorderen. Soms werden speciale bioreactoren gebruikt met volumes van 1-10 L en werden veelzijdige condities getest zoals: anaëroob (met uitsluiting van zuurstof)-aëroob (onder invloed van zuurstof), vochtgehalte en droog-nat cycli en UV-bestraling. Het eerste bewijs dat TNT door aërobe bacteriën kan worden afgebroken werd in 1971 geleverd door Bringmann en Kuehn (11). Won et al. (12) en Traxler (13) waren in 1974 de eersten die gebruik maakten van (*Pseudomonas*) bacteriën.

Reeds in 1980 verschenen er twee overzichtsartikelen over de afbraak van TNT. Spanggord et al. (14) verzamelden literatuur over het transport van TNT en afbraakprodukten in industrieel afvalwater. Isbister et al. (15) bestudeerden de micro-biologische afbraak van TNT, 2,4-dinitrotolueen (2,4-DNT) en hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). Beide rapporten concludeerden dat via reductie van nitro-groepen van het TNT molecuul monoaminodinitrotoluenen zoals 2-amino-4,6-dinitrotolueen (2-A), 4-amino-2,6-dinitrotolueen (4-A) en condensatieprodukten zoals bijvoorbeeld tetranitroazoxytolueen gevormd werden. De reductie van de nitrogroepen kan gerealiseerd worden onder invloed van verscheidene micro-organismen zoals bacteriën, gisten en schimmels. Een definitief bewijs van de splitsing van de TNT-ringstructuur om uiteindelijk tot een volledige mineralisatie te komen werd echter niet geleverd.

In een gedetailleerd literatuuroverzicht (56 artikelen) beschrijft Walsh de ontwikkelingen tot aan 1990 (16). Uitgebreid onderzoek werd verricht door Kaplan and Kaplan (17-19). Gebruik werd gemaakt van  $^{14}\text{C}$ [TNT] dat gedurende 91 dagen in compost werd geïncubeerd. Na 24 dagen werden TNT, 2-A en 4-A geïdentificeerd waarbij 4-A als hoofdcomponent werd gevonden. Na 91 dagen werd TNT, 2-A, 2,4-diamino-6-nitrotolueen (2,4-DA), 2,6-diamino-4-nitrotolueen (2,6-DA), 2,2',6,6'-tetranitro-4,4'-azoxytolueen (4,4' Az) en 4,4',6,6'-tetranitro-2,2'-azoxytolueen (2,2' Az) gevonden. Eveneens werd geen significante hoeveelheid  $^{14}\text{CO}_2$  teruggevonden. Wel bleek dat na verloop van tijd in toenemende mate  $^{14}\text{C}$ -gelabeld materiaal gebonden werd aan de organische fractie van de compost. Een jaar later vonden dezelfde auteurs overeenkomende resultaten in grond ten aanzien van de humusfractie. Een schema van de micro-biologische afbraak van TNT volgens Kaplan en Kaplan (18) wordt gegeven in figuur 2.

Micro-biologische afbraak van TNT onder aërobische als anaërobische condities verloopt voornamelijk via een reductie. De para-nitrogroep van TNT wordt gereduceerd via nitroso- en hydroxylamino-intermediären tot aminodinitrotoluenen. Onder aërobe condities kunnen via de instabiele hydroxylamino-intermediären resistente azoxy dimeren ontstaan.



Figuur 2: Schema micro-biologische afbraak van TNT (18).

Een vergelijkbaar afbraakpatroon van TNT naar 4-A, 2-A, 2,4-DA en 2,6-DA werd eveneens gevonden door Hoffsommer et al. (20) tijdens experimenten waarbij een 10-50 mg/L oplossing van TNT gepompt werd in een belucht systeem van bacteriën en voedingsstoffen. Van de gelabelde verbinding was 34% van de totale  $^{14}\text{C}$  hoeveelheid omgezet in amines waarvan 26% in de bovenstaande vloeistof en 8% in het bezinksel van micro-organismen en voedingsstoffen. Na 30 dagen was de activiteit geassocieerd met amines afgenomen tot 3% waarvan minder dan 0,3% in de bovenstaande vloeistof en 2,8% in het bezinksel. De grootste hoeveelheid van de totale  $^{14}\text{C}$  activiteit (40-60%) werd echter gevonden in het bezinksel. Evenals Kaplan en Kaplan (18) veronderstelde men dat hoog-moleculaire onoplosbare polymeerachtige stoffen gevormd zijn. Een vergelijkbaar experiment op laboratoriumschaal werd uitgevoerd door Isbister et al. (21) waarbij eveneens vorming van onoplosbare macromoleculen verondersteld werd.

De opname van TNT en ontledingsprodukten in grond en planten en een overzicht van de micro-biologische afbraak werd gegeven door Pennington (22, 23). De opname in planten van TNT en 4A bleek gering, 2A bleek niet te worden opgenomen. De experimenten toonden verder aan dat de maximale adsorptie (verzadiging actieve plaatsen in grond) al bereikt wordt bij een concentratie van 16 ppm TNT. In een ander onderzoek van dezelfde auteur werd de biotische en abiotische

(nat/droog cycli en photochemisch) afbraak van TNT in grond bestudeerd. Het belangrijkste ontledingsprodukt blijkt opnieuw 4A te zijn. De concentratie 4A was hoger dan die van TNT in de grond en de vorming onafhankelijk van de behandeling die de grond onderging. De concentratie werd bepaald met HPLC-UV en HPLC-scintillatie detectie. Via de gelabelde verbinding kon worden aangetoond dat een gering deel mineraliseert tot  $^{14}\text{CO}_2$ , voornamelijk na biotische behandeling, en dat circa 70%  $^{14}\text{C}$  niet extraheerbaar is en achterblijft in de grond. Het achterblijven van een niet-extraheerbaar deel van TNT werd later weer aangetoond via  $^{14}\text{C}[\text{TNT}]$  zelfs na 91 dagen incubatie. Kaplan en Kaplan (18) en later Cataldo et al. (24) toonden aan dat er een relatie is tussen niet-extraheerbaar  $^{14}\text{C}$  en de humusfractie van de grond. Men veronderstelt dat TNT en/of degradatieproducten conjugereren met de humusfractie.

Mineralisatie tot  $^{14}\text{CO}_2$  bleef echter beperkt tot enkele procenten. Meer succes werd verkregen door combinatie van fotochemische omzetting en biotische degradatie. Kearny et al. (25) behandelden de TNT-oplossing eerst met UV en vervolgens met *Pseudomonas putida*. Met deze methode werd 25% van de gelabelde verbinding in de vorm van  $^{14}\text{CO}_2$  teruggevonden. Ook veelbelovend zijn de resultaten van Fernando, Aust (26) en Tsai (27) waarbij met UV bestraald water behandeld werd met de fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Hierbij werd 30 tot 50% van het toegevoegde TNT gemineraliseerd.

De bovenvermelde resultaten werden in het laboratorium verkregen. De snelheid van de micro-biologische afbraak in situ en via bemesting blijkt echter nog niet volledig duidelijk (18). Het is mogelijk dat reactieve tussenproducten adsorberen aan anorganische en organische oppervlakken van verbindingen aanwezig in de grond of ten gevolge van de hoge polariteit via het grondwater uitspoelen (28, 29). Kaplan en Kaplan (18) postuleren dat composteren niet geschikt is voor in situ reiniging van met TNT en andere explosieve stoffen verontreinigde grond. Hoewel in andere meer recente studies (3) beweerd wordt dat de resultaten bemoedigend zijn. De milieufactoren die een in situ degradatie van TNT zouden kunnen beïnvloeden werden recent (1995) bestudeerd door Bradley en Chapelle (3). Boven concentraties van 100  $\mu\text{mol}$  TNT in grond, gecombineerd met drogen, werd een significante toxische remming gevonden, terwijl maximale mineralisatie werd gevonden bij 52% vochtgehalte. Additie van cellobiose of andere voedingsstoffen veroorzaakte eveneens een significante remming in de TNT-mineralisatie. Zij concluderen dat de aanwezige micro-organismen de voorkeur geven aan minder recalcitrante substraten indien die voorradig zijn. Dit resultaat is vrij controversieel aangezien toevoeging van een voedingssupplement, bijvoorbeeld maïskolven bij gebruik van de fungus *P. chrysosporium* (30), juist de mineralisatie bevordert. Ook in combinatie met *Pseudomonas*-type bacteriën werd een versnelde afbraak waargenomen onder toevoeging van gist of glucose.

Tenslotte zijn de resultaten behaald met DNA-recombinatie technieken waarbij bacteriestammen geconstrueerd zijn die nitrotoluenen volledig kunnen mineraliseren, voor in situ grondbehandeling veelbelovend (31).

## 2 Aanbevelingen voor analytisch onderzoek

### 2.1 Houdbaarheid van TNT-grondmonsters

De houdbaarheid van water en grondmonsters verontreinigd met explosieve stoffen waaronder TNT werd uitvoerig onderzocht door Maskarin et al. (32). Het doel van de studie was gegevens te verkrijgen over de houdbaarheid van de monsters bij kamertemperatuur, 4 °C en -20 °C. Dit mede om degradatie in het monster te kunnen voorspellen als de monsters niet onder de ideale omstandigheden konden worden bewaard. Alleen bij hoge concentraties (100 ppm) bleken de monsters maximaal 2 weken houdbaar bij 4 °C terwijl van explosieve stoffen als octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) en RDX de houdbaarheid 6 weken is. Bij lage concentraties (9 ppm) bleek de houdbaarheid zo gering, dat geconcludeerd werd dat TNT en DNT-data niet representatief zijn voor de mate van contaminatie van de grond indien de analyse niet onmiddellijk na de monsternam plaatsgevonden heeft. Grondmonsters die TNT bevatten dienen onmiddellijk ingevroren te worden tot -20 °C en kunnen maximaal 6-8 weken bewaard worden. Deze resultaten werden bevestigd in een onderzoek van Grant et al (33). Ook zij vonden een snelle afbraak van TNT toegevoegd aan grond en bewaard bij 2 °C en concludeerden dat de monsters bij -15 °C bewaard moeten worden. Beiden rapporteerden een sterke afhankelijkheid van de degradatie van de grondsoort en dat in bepaalde grondsoorten zelfs bij -15 en -20 °C afname optreedt van 2,4-DNT.

#### 2.1.1 Extractie van grond

Verscheidene extractiemiddelen zoals: diethylether, methyleenchloride, benzeen - later vervangen door toluen - werden toegepast voor de vloeistof-vloeistof of vloeistof-grond extractie van explosieve stoffen. Voor extractie van TNT onderzocht Pennington (23) de extractievloeistoffen aceton, methanol, benzeen en methyleenchloride. Aceton en methanol bleken het meest geschikt als extractiemiddel in combinatie met gedroogde grond. Jenkins et al. (34) concluderen dat ultrasone extractie in methanol een beter resultaat geeft vergeleken met Soxhlet of mechanische extractie. De ultrasone behandeling van 18 uur is echter uitzonderlijk lang. De methode wordt vaak toegepast, waarbij in plaats van methanol ook acetonitril wordt gebruikt. Na de ultrasoon behandeling wordt na 30 minuten 5 g/l  $\text{CaCl}_2$  toegevoegd - deze stap wordt door andere onderzoekers vaak weggelaten - en na flokkulatie (15 minuten) wordt tenslotte gefiltreerd. De extractie en concentratie van de extractievloeistof dient in het donker te gebeuren in verband met de omzetting van TNT in daglicht. Deze methode vormt de basis voor de US Environmental Protection Agency (EPA) conceptmethode: Solid Waste 846 Method 8330 (35).

Resultaten van extractie van grond via adsorptiekolommen (solid phase) en membranen werden door Jenkins et al. (36) vergeleken met de resultaten van de klas-

sieke vloeistofextractie in combinatie met uitzouten. Voor het terugvinden van nitroaromaten in water en grondwater monsters voldeden alle drie methoden (recovery, circa 90%). De membraan-extractie methode bleek de meest eenvoudige en snelste methode maar kan achtergrondproblemen geven. Zowel membraan-extractie als solid-phase extractie hebben ten opzichte van vloeistof-extractie in combinatie met uitzouten als voordeel dat het concentreren via het tijdrovende indampen achterwege kan blijven.

De recovery van nitramines is echter laag (37-39). Maskarinec et al. (39) verkregen uitstekende recoveries door gebruik te maken van divinylbenzeenvinylpyrrolidon co-polymeer. Nadeel is echter dat van het co-polymeer UV-detecteerbare stoffen extraheren die de analyse kunnen storen.

Hale et al. (10) vonden dat de recovery van TNT in grond sterk concentratie afhankelijk is. Van ppm concentraties TNT in grond (>1 ppm) werd 70-90% teruggevonden, rond 0.5 ppm nog circa 40% en vanaf 0.1 ppm kon niets meer worden teruggevonden. Het algemeen optreden van dit effect kan niet goed gecontroleerd worden aan de hand van de literatuur, omdat vaak de concentratie gegevens bij recovery experimenten ontbreken en meestal met hoge ppm concentraties gewerkt wordt. Het effect kan mogelijk veroorzaakt zijn door een inefficiënte extractie aangezien gebruik werd gemaakt van diethylether als extractiemiddel.

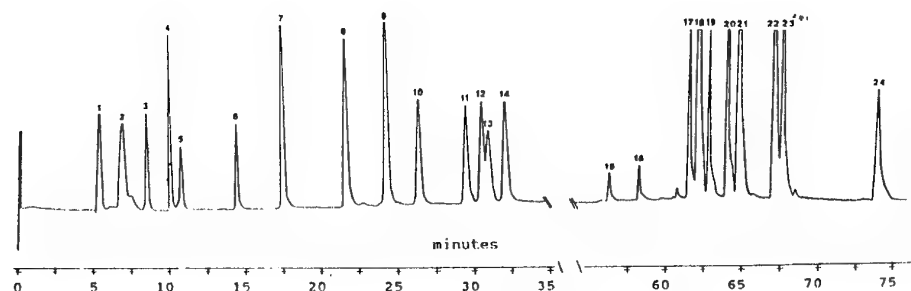
## 2.2 Analyse van TNT en degradatieprodukten

Hoewel het goed mogelijk is om TNT via gaschromatografie te analyseren verdient vloeistofchromatografie (LC) de voorkeur indien TNT samen met polaire ontledingprodukten of andere explosieve stoffen geanalyseerd moet worden. LC wordt daarom ook het meest toegepast. In de meeste gevallen werd gebruik gemaakt van kolommen met een hydrofobe alkylfunctie (C18 of C8) en van kolommen met een cyaanfunctie (CN) (34, 36). In een recent rapport (1993) concentreerden Jenkins en Golden (40) zich op de scheiding van de meest voorkomende analieten in met explosieve stoffen verontreinigde grond of water (tabel 1).

Tabel 1: Meest voorkomende analieten in grond en watermonsters verontreinigd met explosieve stoffen (41).

Analiët	frequentie van voorkomen (%)	
	grond	water
TNT	63	56
TNB	44	28
RDX	35	61
2,4-DNT	26	21
DNB	22	13
2-A-DNT	18	23
HMX	14	14
Tetryl	12	13

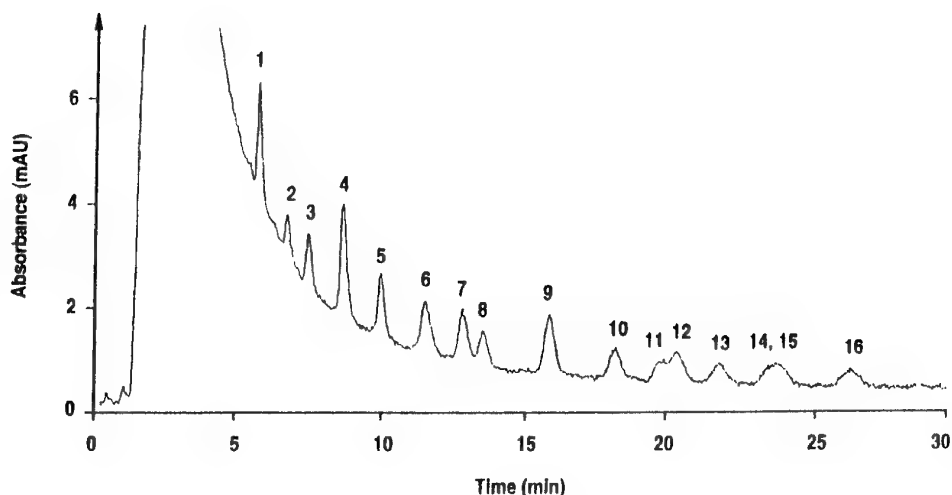
Een optimale (volledige) scheiding werd verkregen van de in tabel 1 genoemde analieten met een ternair eluentsysteem van 65/12/23 (v/v/v) water/methanol/acetonitril in combinatie met een Supelco LC-CN-kolom. Major et al. (42) ontwikkelde een screeningsmethode voor explosieve stoffen, ontledingsprodukten en polycyclische aromaten (PAKs) waarbij gebruik gemaakt wordt van een water/methanol gradient gecombineerd met een C18 en PAK-kolom (figuur 3).



- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| 1 Nitroguanidine (NQ)  | 13 2,6-Dinitrotoluene (2,6-DNT) |
| 2 2,4,6-Trinitrophenol (Picric acid)                         | 14 2,4-Dinitrotoluene (2,4-DNT) |
| 3 1-Acetyloctahydro-3,5,7-trinitro-1,3,5,7-tetrazocine (SEX) | 15 Naphtalene                   |
| 4 Cyclotetramethylenetetranitramine (HMX)                    | 16 Acenaphthylene               |
| 5 1-Acetylhexahydro-3,5-dinitro-1,3,5-triazine (TAX)         | 17 Fluorene                     |
| 6 Cyclotrimethylenetrinitramine (RDX)                        | 18 Phenanthrene                 |
| 7 1,3,5-Trinitrobenzene (DNB)                                | 19 Anthracene                   |
| 8 1,3-Dinitrobenzene (DNB)                                   | 20 Fluoranthrene                |
| 9 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)                                | 21 Pyrene                       |
| 10 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)                               | 22 Benz (a) anthracene          |
| 11 4-Amino-2,6-Dinitrotoluene (4-Amino-DNT)                  | 23 Chrysene                     |
| 12 2-Amino-4,6-Dinitrotoluene (2-Amino-DNT)                  | 24 Benzo (a) pyrene             |

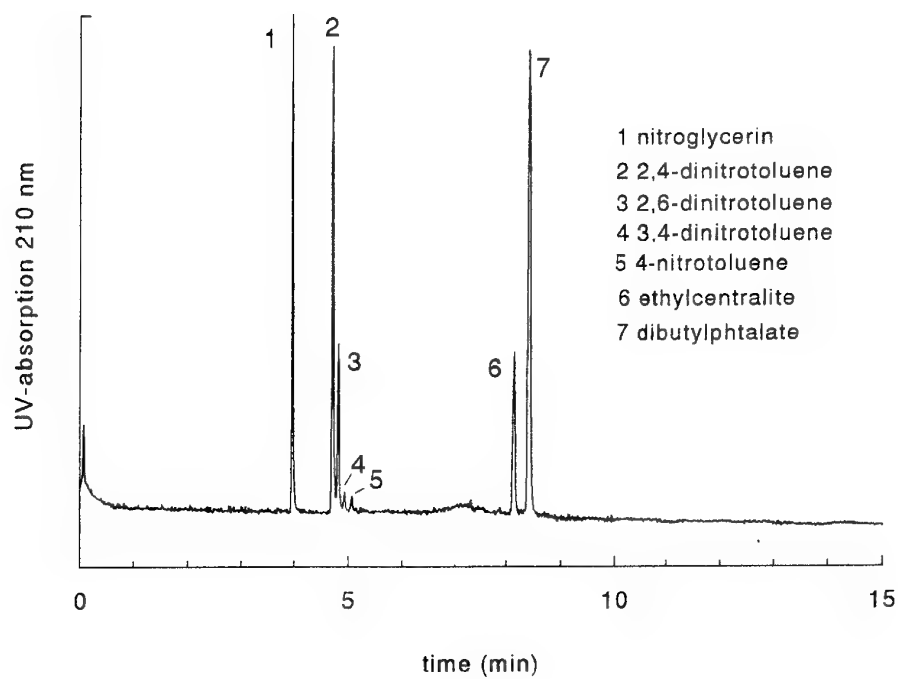
Figuur 3: LC chromatogram van ontledingsprodukten en PAKs.

Een vergelijkbare aanpak van geschakelde kolommen maar nu onder isocratische condities werd recent gepubliceerd door Bouvier en Oehrlé (43). Hierbij werden C8, C18, phenyl en cyano-kolommen getest voor een optimale scheiding van 16 explosieve stoffen en ontledingsprodukten. De beste combinatie gaf de C8-kolom en cyano-kolom. In combinatie met solid phase extractie kon op ppb-gebied een goede scheiding verkregen worden. Figuur 4 toont een voorbeeld van grondwater waaraan verscheidene explosieve stoffen werden toegevoegd met een concentratie van circa 1 ppb.



**Figuur 4:** LC chromatogram grondwater gespiked met explosieve stoffen (1 ppb).  
Kolommen: 10 cm x 3,9 mm Nova-Pak C8 en CN HP in serie. Mobiele fase; water-isopropanol (82:18 v/v); flowsnelheid 1 ml/min; detectie UV 254 nm,  
Pieken: 1 = 1,3,5-trinitrobenzeen, 2 = HMX, 3 = RDX,  
4 = 1,3-dinitrobenzeen, 5 = TNT, 6 = nitrobenzeen, 7 = 3,5-dinitroaniline,  
8 = tetryl, 9 = 2,4-DNT, 10 = 2,6-DNT, 11 = 3,4-DNT, 12 = 2A-DNT,  
14 = 4-nitrotolueen, 15 = 2-nitrotolueen, 16 = 3-nitrotolueen.

Naast de getoonde succesvolle LC-methoden is het gebruik van micellaire elektrokinetische capillaire elektroforese (MECC) als snelle screeningsmethode eveneens zeer geschikt. Hierbij wordt aan de buffer een oppervlakte actieve stof als natriumdodecylsulfaat toegevoegd. De gekozen concentratie ligt boven de kritische micel-concentratie zodat zich micellen vormen in de oplossing. Deze micellen functioneren als pseudo-stationaire fase. De te scheiden explosieve stoffen en ontledingsprodukten zullen verschillen in verdeling vertonen tussen de apolaire micellen en de polaire buffer oplossing. Deze techniek werd recent toegepast voor de scheiding van explosieve stoffen (44-46). Door de hoge scheidingsefficiëntie van deze methode zijn meer analieten in een korte tijd te bepalen. Het volgende voorbeeld, figuur 5, toont een MECC analyse van kruitcomponenten zoals op het TNO Prins Maurits Laboratorium (TNO-PML) tot stand werd gebracht.



**Figuur 5:** CE-analyse kruitmonster.  
Capillair: 80 (65) cm L x 75  $\mu$ m ID fused silica,  
0,015 M boraat pH 8,5 en 0.025 SDS; 30 kV, injectie 15 nl.



### 3 Conclusies en aanbevelingen

De biologische afbraak van TNT onder aërobe zowel als anaërobe condities verloopt voornamelijk via een reductie. De para-nitrogroep van TNT wordt gereduceerd via nitroso- en hydroxylamino-intermediären tot aminodinitrotoluenen. Hierbij kunnen resistente azoxy dimeren ontstaan. De gevormde ontledingsproducten zijn in verband met hun toxiciteit echter minder gewenst dan TNT. Daarnaast wordt veelvuldig gemeld dat een belangrijk deel (20-60%), afhankelijk van de grond, permanent en in een nog onbekende vorm gebonden wordt aan de humusfractie. De meest betrouwbare experimenten om de afbraak van TNT te volgen zijn daarom die experimenten waar gebruik gemaakt werd van ring-gelabelde  $^{14}\text{C}[\text{TNT}]$ .

Mineralisatie van TNT treedt uitsluitend onder aërobe condities op waarbij de opbrengst het hoogste is indien de micro-biologische afbraak gecombineerd wordt met een fotochemische degradatie.

De monsterbehandeling en -opslag blijken de meest kritische factoren te zijn in het analytisch onderzoek. Monsters dienen in het donker snel gekoeld of bij voorkeur snel ingevroren te worden. Aangezien dit in de praktijk vaak niet eenvoudig te realiseren is, verdient het aanbeveling te onderzoeken of in situ solid phase extractie via grondwater of aan grond toegevoegd water op C18-kolommen mogelijk is. De in de literatuur vaak toegepaste ultrasone extractie gedurende 18 uur is aanzienlijk langer dan die door het TNO-PML werd toegepast (1 uur). In verband met de chemische degradatie van TNT in water, zeker onder invloed van licht, verdient het aanbeveling extractiebuizen van donker glas te gebruiken en te onderzoeken of een korte ultrasoon behandeling voldoet.

De LC-analyse van TNT en degradatieproducten zelfs in de aanwezigheid van andere explosieve stoffen vormt geen probleem. Gebruik van C18-kolommen in combinatie met circa 1:1 v/v water/methanol of acetonitril volstaat in de meeste gevallen. Indien zich dan nog scheidingsproblemen voordoen kan ook gebruik worden gemaakt van CN-kolommen. Bovendien zijn de ontwikkelingen met MECC veelbelovend. Ondanks deze positieve ontwikkelingen op analytisch gebied is er een gebrek aan gestandaardiseerde en/of gecertificeerde analyse-methoden. Walsh et al. (41) stellen dat dit wordt veroorzaakt door het ontbreken van goede gecertificeerde referentiestoffen. Ook bij dit laatste probleem zou het TNO-PML in de toekomst een rol kunnen spelen.

## 4 Literatuur



- 1 Higson, F.K.,  
In *Advances in Applied Microbiology*; Neidleman, S.L.; Laskin, A.I., Eds.;  
Academic Press, Inc.: New York, 1992, Vol. 37, 1.
- 2 Won, W.D.; DiSalvo, L.H.,  
*J. Appl. Environ. Microbiol.* 31 (1976) 576.
- 3 Bradley, P.M.; Chappelle, F.H.,  
*Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 802.
- 4 Spanggord, R.J.; Mabey, W.R.; Chuo, T.W.; Smith, J.H.,  
In: D.E. Rickert (ed.). *Toxicity of Nitroaromatic Compounds*. McGraw Hill,  
Washington, D.C. (1985) 15.
- 5 Rippen, G., (1989),  
*Handbuch der Umweltchemikalien: Stoffdaten-Pruefverfahren-Vorschriften*  
(2. Aufl.), Band 16 (1992). Erg. Lfg. Ecomed, Landsberg.
- 6 Burlinson, N.E.; Kaplan, L.A.; Tzinan, M.E.S.; Glover, D.J.,  
In: *Photochemistry of TNT and Related Nitroaromatics-Final report*. MRDC  
Contract MIPR No. 6968. Naval Surface Weapons Laboratory, Silver Spring,  
MD, USA (1978).
- 7 Spanggord, R.J.; Mill, T.; Chuo, T.; Mabey, W.; Smith, J.; Lee, S.,  
*Environmental Fate Studies on Certain Munition Wastewater Constituents*  
(1980) - Lab Studies. ADA 099256. SRI International, Menlo Park, CA, USA.
- 8 Mabey, W.R.; Tse, D.; Baraze, A.; Mill, T.,  
*Chemosphere* 12 (1983) 3.
- 9 Weston, W.R.F.,  
Inc., *Literature Overview on Microbial Degradation and Land farming of Pink*  
*Water*. US Army Toxic and hazardous Materials Agency Report DAAK11-85-  
D-07, Aberdeen Proving Ground, MD. USA (1985).
- 10 Hale, V.Q.; Stanford, T.B.; Taft, L.G.,  
Report DAMD 17-76-C-6065. U.S. Army Medical Bioengineering Research  
and Development Laboratory, Fort Detrick, Frederick, MD, USA (1979).
- 11 Bringmann, G.; Kuehn, R.,  
*Biologischer Abbau von Nitrotoluolen und Nitrobenzolen mittels Azotobacter*  
*Agilis*. *Gesund. Ing.* 9/92 (1971) 273.

- 12 Won, D.; Hecly, R.J.; Glover, D.J.; Hoffsommer, J.C.,  
Appl. Microbiol., 27 (1974) 513.
- 13 Traxler, R.W.; Wood, E.; Deaney, J.M.,  
Developmental Industrial Microbiol. 16 (1974) 71.
- 14 Spanggord, R.J.; Mill, T.; Chuo, T.; Mabey, W.; Smith, J.; Lee, S.,  
Literature review, SRI International, Menlo Park, CA, USA, ADA082372.
- 15 Isbister, J.D.; Anspach, G.L.; Kitchen, J.F.; Doyle, R.C.,  
Microbiol. 7 (1984) 47.
- 16 Walsh, M.E.,  
Report No. 90-2, US Army Cold Regions Research and Engineering Laboratory, Hanover, NH, USA.
- 17 Kaplan, D.L.; Kaplan, A.M.,  
Appl. Environ. Microbiol. 44 (1982) 757.
- 18 Kaplan, D.L.; Kaplan, A.M.,  
BioCycle 23 (1982) 42.
- 19 Kaplan, D.L.; Kaplan, A.M.,  
Anal. Chim. Act. 136 (1982) 425.
- 20 Hoffsommer, J.C.; Kaplan, L.A.; Glover, D.J.; Kubose, D.A.; Dickinson, C.;  
Goya, H.; Kayser, E.G.; Groves, C.L.; Sitzmann, M.E.,  
Naval Surface Weapons Center, Silver Spring, MD, USA, NSWC/WOL-TR-77-136 (1978) USA.
- 21 Isbister, J.D.; Doyle, R.C.; Kitchens, J.F.,  
Engineering and Development Support of General Decon Technology for the  
DARCOM Installation Restoration Program. Task 6-Adapted/Mutant Biological  
Treatment. Phase I (1980) -Literature Review. Atlantic Research Corporation,  
Alexandria, VA, USA.
- 22 Penington, J.C.,  
Soil Sorption and Plant Uptake of TNT. (1980) Report no. EL-88-12, USA  
EWES Environmental Lab., P.O. Box 631 Vickburg, MS, USA.
- 23 Pennington, J.C.; Hayes, Ch.A.; Price, C.B.; McCormick, E.,  
(1992) Report no. EL-92-37, USA EWES Environmental Lab., P.O. Box 631  
Vickburg, MS, USA.

- 24 Cataldo, D.A.; Harvey, S.D.; Fellows, R.J.; Beam, R.M.; McVeety, B.D.,  
An Evaluation of the Environmental Fate and Behavior of Munitions Materiel  
(TNT, RNX) in Soil Plants Systems. (1989) Pacific Northwest Lab. for US  
Army Medical Research and Development Command, Fort Detrick, Frederick,  
MD, USA.
- 25 Kearny, P.C.; Zeng, Q.; Ruth, J.M.,  
Chemosphere 12 (1983) 1583.
- 26 Fernando, T.; Bumpus, J.A.; Aust, S.D.,  
Appl. Environ. Microbiol. 56 (1990) 1666.
- 27 Tsai, T.S.; Turner, R.J.; Sanville, C.J.,  
Biotreatment of Red Water with Fungal Systems. DE 91-006501. National  
Technical Information Service, US Department of Commerce, Springfield,  
VA, USA.
- 28 Pennington, J.C.; Patrick, W.H.,  
J. Environ. Qual. 19 (1990) 559.
- 29 Haderlein, S.B.; Schwarzenbach, R.P.,  
Environ. Sci.Technol. 27 (1993) 316.
- 30 Osmon, J.L.; Klausmeier, R.E.,  
Dev. Ind. Microbiol. 14 (1972) 247.
- 31 Duque, E.; Haidour, A.; Godoy, F.; Ramos, J.L.,  
J. Bacteriol. 175 (1993) 2278.
- 32 Maskaring, M.P.; Bayne, L.K.; Jonson, L.H.; Holladay, S.K.; Jenkins, R.A.,  
Report, Oak Ridge National Lab., TN, USA (1991).
- 33 Grant, C.L.; Jenkins, T.F.; Golden, S.M.,  
Report 93-11 US Army Cold Regions Research and Engineering Lab.,  
Hanover, NH, USA (1993).
- 34 Jenkins, T.F.; Walsh, M.E.; Schumacher, P.W.; Miyares, P.H.; Bauer, C.F.;  
Grant, C.L.,  
J. of AOAC 72 (1989).
- 35 Test Methods for Evaluating Solid Waste, Proposed Update II, Method 8330,  
U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, EPA Report  
SW846, 3rd ed., November 1992

- 36 Jenkins, T.F.; Miyares, P.H.; Myers, K.F.; McCormick, E.F.; Strong, A.,  
Special Report 92-25. US Army Cold Regions Research and Engineering  
Laboratory Hanover, NH, USA (1992).
- 37 Freeman, D.H.; Angeles, R.M.; Poinescu, I.C.,  
J. Chromatogr., 118 (1976) 157.
- 38 Richard, J.J.; Junk, G.A.,  
Anal. Chem., 58 (1986) 723.
- 39 Maskarinec, M.P.; Manning, D.L.; Harvey, R.W.; Griest, W.H.; Tomkins,  
B.A.,  
J. Chromatogr., 302, (1984) 51.
- 40 Jenkins, T.F.; Golden, S.M.,  
Special Report 93-14, Army Cold Regions Research and Engineering Labora-  
tory, Hanover, NH, USA (1993).
- 41 Walsh, M.E.; Jenkins, T.F.; Miyares, P.H.; Schnitker, P.S.; Eiwel, J.W.; Stutz,  
M.H.,  
Report 93-5, US Army Cold Regions Research and Engineering Laboratory,  
Hanover, USA.
- 42 Major, M.A.; Checkai, R.T.; Phillips, C.T.; Wentzel, R.S.; Nwanguma, R.O.,  
Intern. J. Environ. Anal. Chem., 48 (1992) 217.
- 43 Bouvier, E.S.P.; Oehrle, S.A.,  
LC-GC-INT., 8 (1995) 338.
- 44 Kleibömer, W.; Cammann, K.; Roberts, J.; Mussenbrock, E.,  
J. Chromatogr., 638 (1993) 349.
- 45 Northrop, D.M.; Martire, D.E.; MacCrehan, W.A.,  
Anal. Chem., 63 (1991) 1038.
- 46 Yik, Y.F.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y.,  
HRC & CC, 15 (1992) 198.

## 5 Ondertekening



Drs. N.H.A. van Ham  
Projectleider

Dr. Ch.E. Kientz  
Auteur

---

ONGERUBRICEERD  
**REPORT DOCUMENTATION PAGE**  
(MOD-NL)

<b>1. DEFENCE REPORT NO. (MOD-NL)</b> TD95-1558	<b>2. RECIPIENT'S ACCESSION NO.</b>	<b>3. PERFORMING ORGANIZATION REPORT NO.</b> PML 1995-A80
<b>4. PROJECT/TASK/WORK UNIT NO.</b> 214495034	<b>5. CONTRACT NO.</b> R87/KL/071	<b>6. REPORT DATE</b> May 1996
<b>7. NUMBER OF PAGES</b> 21 (excl. RDP & distribution list)	<b>8. NUMBER OF REFERENCES</b> 46	<b>9. TYPE OF REPORT AND DATES COVERED</b> Final
<b>10. TITLE AND SUBTITLE</b> Abiotische en biotische afbraak van 2,4,6-trinitrotolueen in grond en water. Literatuurstudie en aanbevelingen voor analytisch onderzoek (Abiotic and Biotic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene in Soil and Water. Literature review and recommendations for analytical method development)		
<b>11. AUTHOR(S)</b> Dr. Ch.E. Kientz		
<b>12. PERFORMING ORGANIZATION NAME(S) AND ADDRESS(ES)</b> TNO Prins Maurits Laboratory, P.O. Box 45, 2280 AA Rijswijk, The Netherlands Lange Kleiweg 137, Rijswijk, The Netherlands		
<b>13. SPONSORING AGENCY NAME(S) AND ADDRESS(ES)</b> EOCKL, Gutenbergweg 10, 4104 BA Culemborg, The Netherlands		
<b>14. SUPPLEMENTARY NOTES</b> The classification designation Ongerubriceerd is equivalent to Unclassified.		
<b>15. ABSTRACT (MAXIMUM 200 WORDS (1044 BYTE))</b> <p>The pollution of soil and water with explosives and related compounds caused by military activities has been known for a long time. In this report the literature describing the abiotic and biotic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and related compounds is reviewed. In recent years progress in understanding the environmental fate of such substances has been made from the many studies published in the past. Recent development using microbial processes that could be used for remediation of TNT-contaminated soils and waste waters look promising.</p> <p>Procedures are reviewed for qualitative screening and subsequent quantitation of residues of TNT employing HPLC including analytical holding times of samples, liquid-liquid and solid phase extraction and recovery. Finally the recent use of micellar electrokinetic capillary electrophoresis for the analysis of TNT and related compounds is discussed.</p>		
<b>16. DESCRIPTORS</b> TNT Breakdown Soils Water Review		<b>IDENTIFIERS</b> Chemical Analysis Capillary Electrophoresis
<b>17a. SECURITY CLASSIFICATION (OF REPORT)</b> Ongerubriceerd	<b>17b. SECURITY CLASSIFICATION (OF PAGE)</b> Ongerubriceerd	<b>17c. SECURITY CLASSIFICATION (OF ABSTRACT)</b> Ongerubriceerd
<b>18. DISTRIBUTION AVAILABILITY STATEMENT</b> Unlimited Distribution		<b>17d. SECURITY CLASSIFICATION (OF TITLES)</b> Ongerubriceerd

Distributielijst \*

- 1\*/2\* DWOO
- 3 DWOO
- 4 HWO-KL
- 5\* HWO-KLu
- 6\* HWO-KM
- 7 EOCKL  
Maj. A. den Breejen
- 8/10 Bibliotheek KMA
- 11 Bureau TNO-DO
- 12\* Lid Instituuts Advies Raad PML  
Prof. dr. F.N. Hooge
- 13\* Lid Instituuts Advies Raad PML  
Prof. dr. U.A. Th. Brinkman
- 14 TNO-PML, Directeur; daarna reserve
- 15 TNO-PML, Directeur Programma; daarna reserve
- 16 TNO-PML, Hoofd Divisie Toxische Stoffen  
Dr. ir. J. Medema
- 17/19 TNO-PML Divisie Toxische Stoffen, Groep Analyse Toxische en Explosieve Stoffen  
Dr. ir. M.S. Nieuwenhuizen, Drs. N.H.A. van Ham en Dr. Ch.E. Kientz
- 20 TNO-PML, Documentatie
- 21 TNO-PML, Archief

---

\* De met een asterisk (\*) gemerkte instanties/personen ontvangen uitsluitend de titelpagina, het managementuittreksel, de documentatiepagina en de distributielijst van het rapport.